

ROGÉRIA CAMPOS MUND

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A TAXA
DE CRESCIMENTO DO TUMOR DE WALKER 256.**

Identificação dos mediadores participantes neste processo

CURITIBA
2004

ROGÉRIA CAMPOS MUND

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A TAXA
DE CRESCIMENTO DO TUMOR DE WALKER 256.**

Identificação dos mediadores participantes neste processo

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre no curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular, do
Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes

CURITIBA
2004

Dedico este trabalho à minha irmã Flávia Campos Mund que foi quem me encorajou a iniciar um trabalho científico, me auxiliando e me incentivando a prosseguir, mesmo quando achava que não conseguiria.

AGRADECIMENTOS

Ao meu “chefe” Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes pela orientação, paciência e oportunidade de ter realizado esse sonho.

Aos meus pais e às minhas irmãs por todo carinho e apoio nos momentos em que mais precisei, obrigado.

À toda minha família que indiretamente contribuiu para a conclusão desse projeto. Obrigado.

À Evelise pela dedicação e cuidado com os “nossos” ratos e pelo empenho na realização dos experimentos que só me ajudaram. Muito, mas muito obrigado mesmo.

À minha grande amiga Cláudia Brandão que esteve comigo desde o começo, na minha intenção de fazer a prova do mestrado, me incentivando e não permitindo nunca que eu desistisse do meu ideal. Obrigada pelos vários momentos em que chorei sem saber por onde ir e você estava lá pra me ajudar a seguir em frente. Obrigado pela paciência nos últimos meses por não conseguir corresponder a certas coisas por falta de tempo. Muito obrigado!!!!!!

Aos meus amigos:

Ricardo Yamazaki, pela eterna paciência e ajuda nos momentos de desespero; por seu carinho e atenção em me fazer “aprender” determinadas técnicas que sem você não teria conseguido. Muito obrigado!

Everson, por todas as horas perdidas na madrugada, quando as luzes da Universidade ainda estavam apagadas, você estava comigo me ajudando na conclusão desse trabalho. Obrigado pelos inúmeros favores, pesquisas e ajudas nesses dois anos de convívio.

Nathália, pelas confidências trocadas nos momentos mais difíceis e pela ajuda no entendimento das técnicas que fizeram parte desse trabalho. Obrigado!

Claudinha, Júlia, pela amizade que vocês me proporcionaram durante esses dois anos nos momentos mais difíceis da minha vida.

Loli, Ricardo T., Maressa, Sandrinho, Lú, Gleisson, Vanessa, Maurício e Dani, pelo carinho de vocês e por me auxiliarem nos experimentos e em minhas dúvidas. Vocês fizeram com que meus dias no laboratório fossem mais divertidos. Muito obrigado.

Dalva, pelas nossas caminhadas saudáveis de fim de tarde e pelas tentativas frustradas em fazer de mim uma pessoa menos sedentária. Obrigado mesmo assim!!!!

À Prof. Dr. Célia Regina Franco pelas inúmeras tentativas em fotografar “nosso tumor” que infelizmente foram frustradas.

Aos funcionários do Biotério pelo auxílio e disponibilidade no cuidado com meus animais. Em especial ao Luis pelos inúmeros “quebra-galhos” de última hora. Obrigado.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas, Gelson e José, que permitiram que nossos experimentos fossem menos complicados.

A todos que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 ÁCIDOS GRAXOS.....	01
1.2 CÂNCER.....	07
1.3 ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER.....	09
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS.....	15
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	15
3.3 REAGENTES, ENZIMAS, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS.....	16
3.4 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	16
3.5 DETERMINAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS E TECIDO TUMORAL.....	17
3.6 CULTIVO CELULAR.....	17
3.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	18
3.7.1 Determinacao de quantificação protéica para peroxidação lipídica.	19
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO.....	19

3.8.1 Western Blotting.....	20
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E2.....	20
3.10 APOPTOSE EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256.....	21
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 PESO TUMORAL	22
4.2 TAXA DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DO TUMOR DE WALKER 256.....	23
4.3 TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO TECIDO TUMORAL.....	24
4.4 TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER 256.....	28
4.5 CONCENTRAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E2 NO PLASMA DE RATOS PORTADORES DE TW256.....	29
4.6 EXPRESSÃO DE COX-2 EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico

AG – Ácidos Graxos

AGE – Ácidos Graxos Essenciais

AL – Ácido Linoléico

ALA – Ácido Alfa- Linolênico

COX – Ciclooxigenase

DHA – Ácido Docosaheptaenóico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

LPO – Peroxidação lipídica

LOX – Lipooxigenase

PG – Prostaglandinas

PUFA – Polyunsaturated fatty acids

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

n – Ômega

rpm – Rotações por minuto

PBS – Tampão Salina Fosfatada

WK – Tumor de Walker 256

MeOH - Metanol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	02
FIGURA 2 – METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS N-3 E N-6.....	05
FIGURA 3 – SÍNTESE DE EICOSANÓIDES A PARTIR DO AA E EPA.....	06
FIGURA 4 – PERFIL DO CONSUMO DE GORDURA E ÁCIDOS GRAXOS DA ESPÉCIE HUMANA AO LONGO DOS ANOS.....	10
FIGURA 5 – PESO (g) DA MASSA TUMORAL OBTIDA NOS GRUPOS NÃO-SUPLEMENTADOS(W), GRUPO SUPLEMENTADO COM GORDURA DE COCO (WS) OU ÓLEO DE PEIXE (WP).....	22
FIGURA 6 – TAXA DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256 ATRAVÉS DA INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA EM DNA.....	23
FIGURA 7 – TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO TECIDO TUMORAL DOS ANIMAIS NÃO-SUPLEMENTADOS, SUPLEMENTADOS COM GORDURA DE COCO OU ÓLEO DE PEIXE.....	27
FIGURA 8 – TAXA DE APOPTOSE DAS CÉLULAS DO TW 256 DOS ANIMAIS SEM SUPLEMENTAÇÃO E SUPLEMENTADOS COM GORDURA DE COCO OU ÓLEO DE PEIXE.....	28
FIGURA 9 – CONCENTRAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E2 NO PLASMA DE RATOS PORTADORES DE TW 256 SEM SUPLEMENTAÇÃO E SUPLEMENTADOS COM GORDURA DE COCO OU ÓLEO DE PEIXE.....	29
FIGURA 10 – EXPRESSÃO DE COX-2 EM TECIDO TUMORAL DE RATOS SEM SUPLEMENTAÇÃO E SUPLEMENTADOS COM GORDURA DE COCO OU ÓLEO DE PEIXE.....	30
FIGURA 11 – ESQUEMA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	35

RESUMO

Dados da Organização Mundial da Saúde (2004), afirmam que a cada ano 10 milhões de pessoas tem diagnóstico positivo de câncer no mundo, equivalente a 12% das mortes. A estimativa é de que até o ano de 2020 serão 15 milhões de novos casos a cada ano. Diante disso, diversos estudos estão sendo realizados na tentativa de se identificar as possíveis causas desse aumento desordenado dessas muitas formas de câncer. Estudos epidemiológicos sugerem que 30% dos casos de câncer estão ligados à dieta, onde o consumo excessivo de gorduras em especial as saturadas e de ácidos graxos n-6 associado a baixa ingestão de ácidos graxos n-3 (AG n-3) facilitam o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer. Interessantemente, populações que consomem maior quantidade de ácido graxo n-3 apresentam menores índices de câncer. O mecanismo pelo qual o ácido graxo polinsaturado n-3 promove essa redução do crescimento tumoral ainda não é conhecido. Neste trabalho foi proposto investigar alguns mecanismos propostos como inibidores do crescimento tumoral pelos AG n-3 em ratos suplementados cronicamente com óleo de peixe por uma geração. Para isso foi determinado o peso do tumor, taxa de proliferação tumoral, taxa de peroxidação lipídica e expressão da COX-2 na massa tumoral, mensuração da concentração de prostaglandinas E2 no plasma, bem como taxa de apoptose nas células do Tumor de Walker 256 (TW256). Ratos Wistar machos de 21 dias foram divididos em três grupos: ratos controle sem suplementação (W), ratos submetidos a suplementação crônica com gordura saturada (WS) ou óleo de peixe (WP) por 50 dias na dose de 1g/ Kg p.c. Após este período, foram inoculados suspensão de células de TW 256 contendo 2×10^7 células/mL. 14 dias após a inoculação, os animais foram ortotanaziados e massa tumoral retirada e pesada. Durante todo esse período, a suplementação não foi interrompida. A suplementação crônica com óleo de peixe reduziu a taxa de crescimento tumoral nos animais. No cultivo das células tumorais dos três grupos encontramos menor taxa de proliferação no grupo WP. Associado a este achado, demonstramos que no grupo WP a taxa de apoptose, peroxidação lipídica estavam elevados ($p < 0,05$) e a expressão da COX-2 e concentração de prostaglandinas E2 estavam significativamente reduzidos quando comparados a W e WS. Em resumo, esses achados mostram que os mecanismos envolvidos na redução do crescimento de tumores pelo óleo de peixe envolvem a redução da COX-2 e PGE2, envolvidas na carcinogênese, bem como aumento da taxa de peroxidação lipídica e apoptose.

ABSTRACT

OMS reported (2004) that 10 million people are cancer positive worldwide. Over the last two centuries the incidence of chronic diseases such as cancer, diabetes among others increased substantially. The reason of this large increase is correlated to high fat acid consumption in particular that of saturated and n-6 fatty acids with reduction of n-3 fatty acids and anti-oxidants agents. Many studies have shown that fish oil supplementation is able to reduce tumor growth rate but the mechanism of action is still unknown. In this reduction in fish oil chronically supplemented tumor-bearing rats. To do so, we got male Wistar rats 21 days old and fed them with regular chow supplemented with coconut fat or fish oil (1g / Kg p.c.) until 70 days old. Then, we inoculated a suspension of Walker 256 ascitic tumor cell (2×10^7 mL) and after 12 days the animals were killed. During whole time the supplementation did not stop. The tumor weight (g) in rats fed normal diet (W) was by 15,33 and in those supplemented with coconut fat (WS) or fish oil (WP) was by 21,46 and 7,82, respectively. These results corroborate our previous work. Tumor cell proliferation rate from WP group was lower as compared to W and WS groups as indicated by the incorporation of 14 C- thymidine in DNA. In addition, apoptosis and peroxidation rate in the tumor from WP group was significantly higher when compared to W and WS groups. Furthermore, the COX-2 expression and plasma concentration of PGE2 were lower in the WP group compared to W and WS groups. Our results confirm that fish oil is able to reduce tumor growth and the mechanisms involved are the increased of apoptosis and lipid peroxidation rate, reduction of COX-2, plasma PGE2 concentration and tumor cell proliferation, in culture.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos Graxos (AG) são ácidos carboxílicos com cadeia hidrocarbônica que contém de 4 a 36 átomos de carbono. Contém sempre número par de carbonos e podem ser classificados como AG de cadeia curta (4 a 6 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos) (LEHNINGER et al, 2002). Geralmente provém da alimentação na forma de triacilgliceróis e são armazenados para reserva energética e metabólica (FAGUNDES, 2002), funcionando como cofatores enzimáticos, detergentes, transportadores, hormônios e mensageiros celulares (ALBERTS et al, 1994).

Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, dependendo do grau de saturação da molécula. Na ausência de duplas ligações são chamados de ácidos graxos saturados. Quando o ácido graxo possui uma única dupla ligação, é denominado monoinsaturado, se contém duas ou mais duplas ligações, poliinsaturado (PUFAs). As duplas ligações têm grande importância pois aumentam a flexibilidade da cadeia e consequentemente a fluidez das membranas biológicas. Os ácidos graxos saturados são normalmente encontrados na forma sólida (gordura) e em produtos de origem animal. A exceção é feita para a gordura do coco, que é rica em ácidos graxos saturados, apesar de ser um alimento de origem vegetal. Os monoinsaturados estão presentes em maior quantidade principalmente no óleo de oliva. Já os poliinsaturados são encontrados em óleos vegetais (girassol, milho, soja, algodão), óleos de peixe e em oleaginosas (castanha, amêndoa).

Existem três famílias importantes de ácidos graxos poliinsaturados: a n-9, representada pelo ácido oléico; a n-6, derivada do ácido linoléico (LA); e a n-3, derivada do ácido α -linolênico (ALA). A distinção entre as famílias de ácidos graxos pode ser realizada pela localização da dupla ligação a partir de sua extremidade metila (DOMMELS, Y.E.M., et al, 2002). Assim, o ácido graxo n-3 apresenta sua primeira

dupla ligação entre os carbonos três e quatro, o n-6 entre os carbonos seis e sete da cadeia hidrocarbônica e o n-9 entre os carbonos 9 e 10 (Figura 1).

Os ácidos linoléico e α -linolênico são precursores de duas famílias de ácidos graxos com efeitos opostos e muito importantes para o funcionamento fisiológico dos tecidos (TAPIERO et al, 2002). Eles não podem ser sintetizados no organismo de mamíferos, devido à ausência das enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ responsáveis pela síntese destes ácidos graxos poliinsaturados, devem ser providos pela dieta (GURR, 1996).

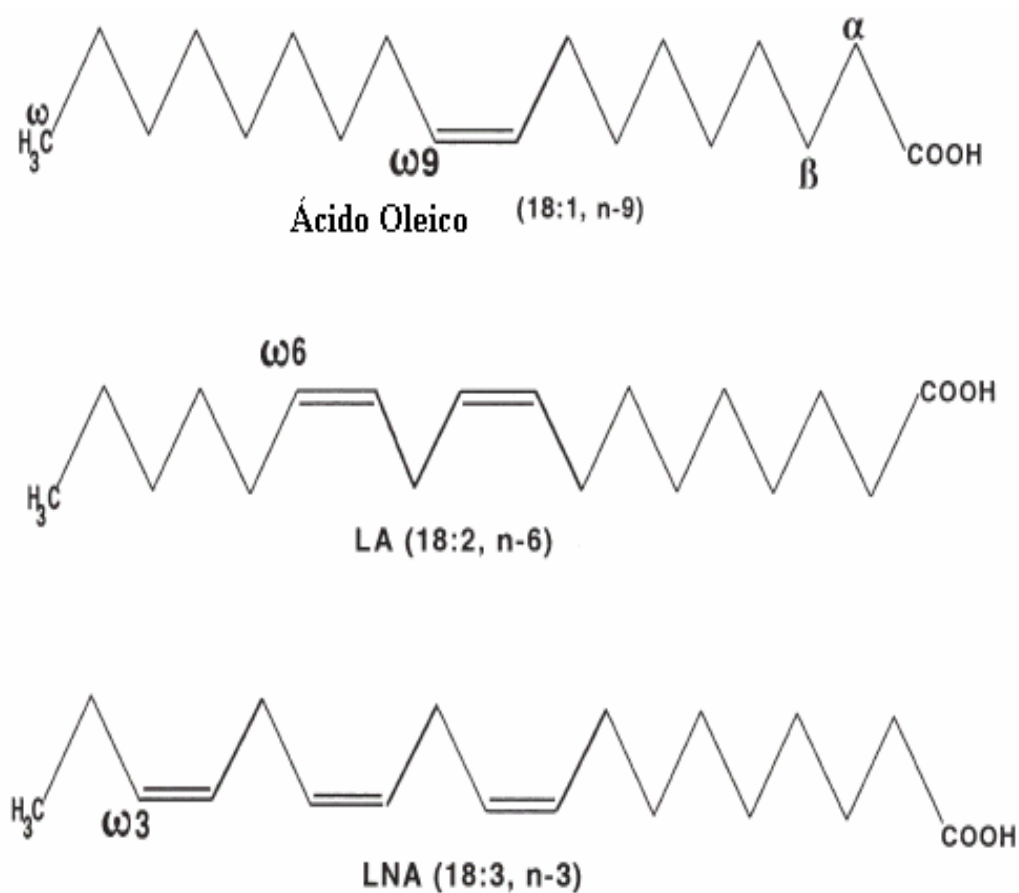


Figura 1: Representação esquemática dos ácidos graxos poliinsaturados. Adaptado de ROSE and CONOLLY, 1999.

Através dos processos de alongamento e dessaturação, presente no retículo endoplasmático liso, ácidos graxos como linoléico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3), adquirem novas duplas ligações e sofrem alongamento de cadeia, dando origem a vários outros ácidos graxos de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (AA 20:4n-6), e o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3), respectivamente (DOMMELS et al, 2002). (Figura 2)

Estas duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas no processo de alongamento e dessaturação, pois são comuns a ambas vias metabólicas, possibilitando que suas diferenças estruturais produzam eicosanóides com funções diferenciadas. Os produtos da família n-6 apresentam características inflamatórias e cancerígenas, favorecendo o aparecimento de patologias como câncer, morte súbita, elevação da pressão arterial, entre outras. Já os da família n-3 tendem a ter propriedades benéficas tais como antiinflamatórias, antiarrítmicas e de reduzir a concentração de lipídios no sangue (ROSE, D.P; CONNOLY, J.M., 1999). (Figura 2)

O ácido araquidônico (n-6) e o ácido eicosapentaenóico (n-3) dão origem a eicosanóides através das enzimas cicloxigenase 2 (COX) e lipoxigenase (LOX). Eicosanóides são moléculas compostas por 20 átomos de carbonos que desempenham funções específicas nas células, entre as quais, potentes sinalizadores que agem como mensageiros de curta duração e distância, afetando os tecidos circunvizinhos. (LEHNINGER, 2002). Os eicosanóides são as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas. A enzima cicloxigenase catalisa a conversão do ácido araquidônico e do EPA em prostanóides (WILLIAMS and DUBOIS, 1996). Existem duas isoformas de COX: a COX-1, que é expressa constitutivamente em muitos tecidos; e a COX-2, associada a respostas inflamatórias e induzidas por vários tipos de estímulos incluindo citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento (Figura 3) (CAO et col., 1996; SEIBERT et al, 1995)

Através dessa enzima, ácidos graxos n-6 formam prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4. Já a família de ácidos graxos n-3, formam a série 3 de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanas) e a série 5 dos leucotrienos. Os eicosanóides produzidos pela família n-6, principalmente prostaglandinas da série 2, apresentam potente efeito inflamatório por possuírem maior atividade vasoconstritora, maior capacidade de agregação plaquetária e serem fortes agentes quimiotáticos. (CURI et al, 2002)

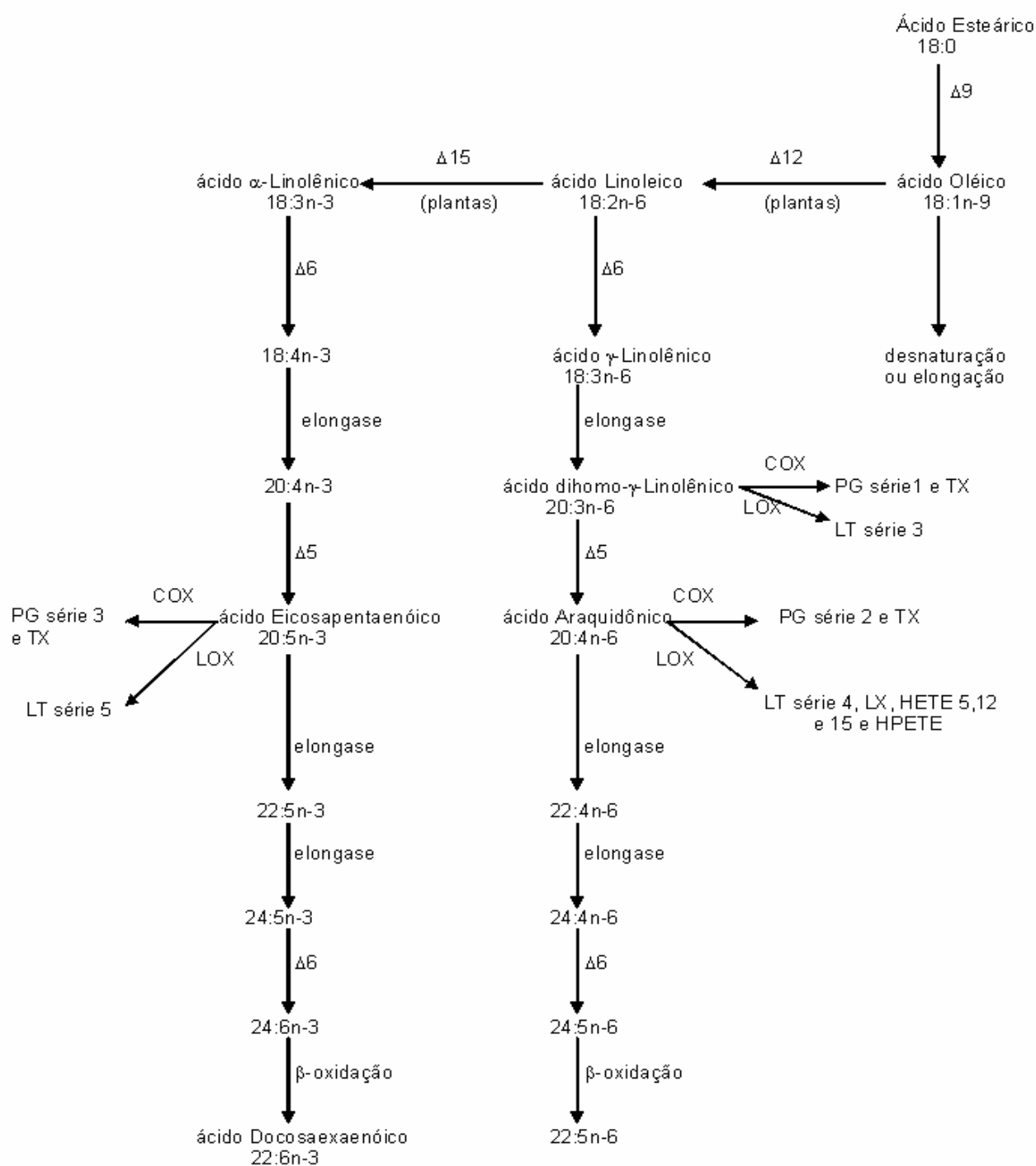


Figura 2: Metabolismo de ácidos graxos n-3 e n-6. Adaptado de CALDER (1998).

Quando se aborda a atuação pró-cancerígena do ácido linoléico, relaciona-se sua atividade com o aumento da síntese de prostaglandinas, uma vez que os tumores de mamíferos convertem o ácido linoléico em araquidonato que formam os eicosanóides da série E2. Estas atuam promovendo crescimento tumoral, vasodilatação, aumento da dor e edema (CALDER, 2003).

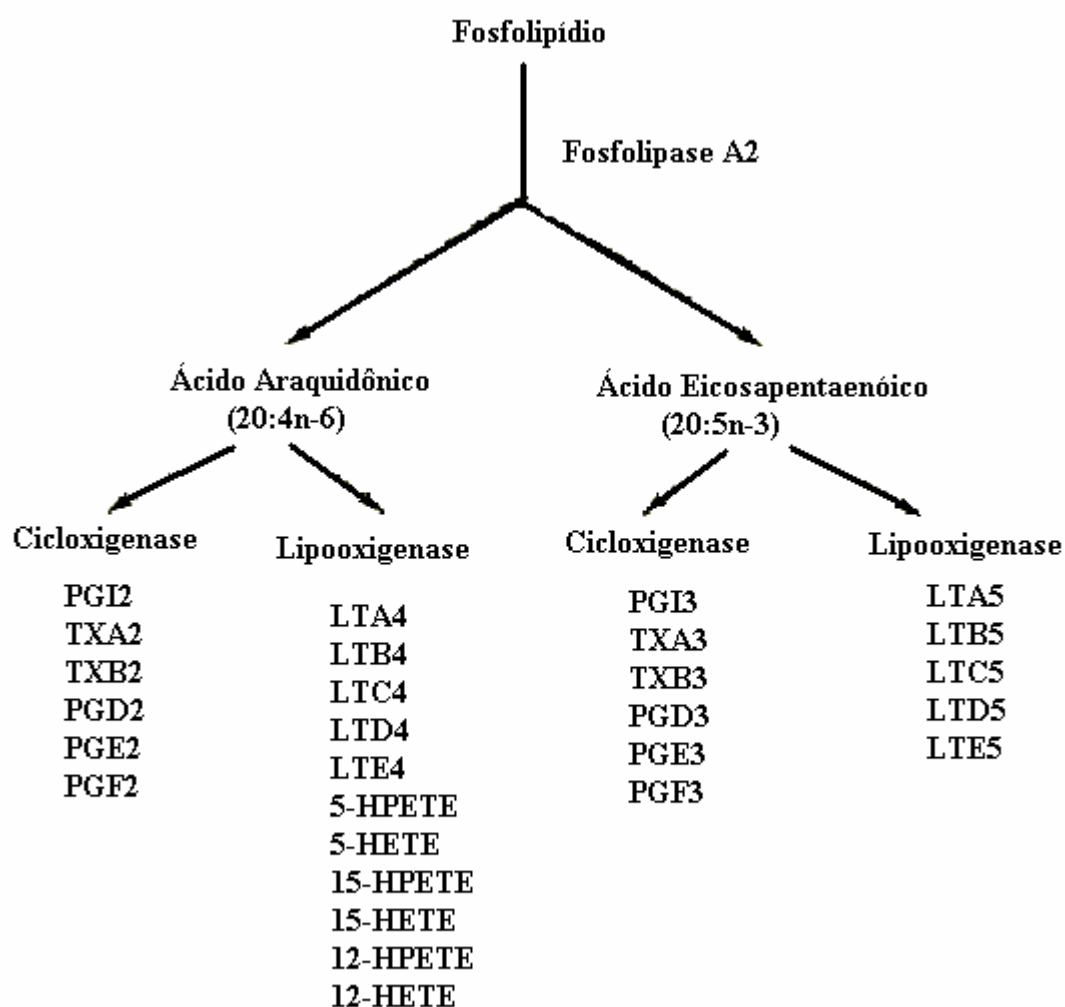


Figura 3: Síntese de eicosanóides a partir do AA e EPA.

Os ácidos graxos ômega-3 são encontrados principalmente em peixes, óleo de peixe, canola e linhaça, nozes, bem como em folhas verdes escuras. O ômega-6 compõe principalmente os óleos vegetais e sementes, como milho, girassol, soja, entre outros (BARTSCH et al, 1999).

1.2 CÂNCER

Câncer é caracterizado pelo aumento desordenado e incontrolado do número de células que, ao alcançarem determinada massa, acabam por invadir e comprimir os tecidos vizinhos. Esse processo ocorre através de alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular. As células geradas são propensas ao rápido crescimento, formando tumores. Os tumores formados podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos são revestidos por cápsula fibrosa que garantem sua retirada sem maiores danos ao organismo. Entretanto, os tumores malignos têm a propriedade de entrar na corrente sanguínea e vasos linfáticos, expressando formas secundárias de tumor ou metástases em outros sítios do corpo (ALBERTS et al, 1997). O câncer pode ser classificado de acordo com o tipo celular ou tecido de onde provém; em que os das células epiteliais são os carcinomas; das musculares e do tecido conectivo, os sarcomas; e nas células do sangue, as leucemias.

Embora ainda desconhecida a etiologia do processo carcinogênico, diversos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento tumoral, dentre eles o fumo, infecções e carcinógenos presentes na dieta alimentar (CURI et al, 2002). Estes fatores acabam transformando a célula normal em célula anormal a qual prolifera-se sem controle até a total debilidade do portador (FERNANDES, 1995).

Dentre os sinais e sintomas que caracterizam o processo neoplásico, estão a anorexia, perda progressiva de peso, intenso catabolismo de carboidratos e proteínas debilitando o organismo e diminuindo a qualidade de vida do portador (BARBER and FEARON, 1999). Esta sintomatologia é caracterizada como síndrome da caquexia, que é complexa e está presente em até 70% dos pacientes com câncer (THEOLOGIDES, 1979; ARGILES, 1999), podendo por si só, levar o indivíduo à óbito.

Diversos estudos sobre câncer e caquexia demonstram que a presença e o crescimento do tumor está invariavelmente associado a má nutrição, induzindo o portador à caquexia. A competição existente entre tumor e hospedeiro acelera os distúrbios metabólicos, permitindo a depleção tanto das reservas de gorduras como às de tecido muscular (ARGILÉS et al, 1997). A perda de peso provocada pelo crescimento tumoral pode variar dependendo do tipo de tumor presente nos pacientes. Em adição, alguns indivíduos portadores de grandes tumores não apresentam sinais de caquexia, enquanto que em outros a caquexia está presente mesmo com o tumor representando 0,01% do peso corporal (TISDALE, 1996; 1997)

Os mecanismos envolvidos na indução da caquexia no câncer não são totalmente conhecidos, entretanto sugere-se que a deficiência na ingestão de proteínas, favoreça a debilidade das reservas energéticas, levando ao quadro anoréxico (DE WYS, 1985). A indução de câncer em animais e o cultivo de células neoplásicas são abordagens importantes para se investigar a dinâmica tumoral bem como as alterações causadas no organismo portador de tumor. Um dos modelos animais mais utilizados em ratos Wistar é o Tumor de Walker 256, caracterizado como carcinossarcoma, identificado pela primeira vez em 1928 (BLACK, J.M. et al, 1994), na mama de uma rata prenhe. George Walker constatou que o crescimento do tumor diminuiu durante o período de lactação, entretanto, voltou a crescer rapidamente, confirmando-se que o mesmo provinha das mamas (EARLE, 1935).

Mais tarde, Agostino e Clifton (1967) descreveram a passagem do tumor da forma sólida para a ascítica. Assim, as células tumorais na forma ascítica poderiam, novamente, ser injetadas intraperitonealmente em outros animais que sempre desenvolviam o tumor ascítico. Estas mesmas células poderiam, ainda, ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, sempre com o desenvolvimento de tumor sólido (CALDAROLA et al, 1968). O tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, entre os anos de 1953 e 1954, o qual se tornou palpável em uma semana, levando à morte após seis semanas (EARLE, 1935; ELSEN, 1940). WK apresenta-se em dois subtipos: tipo A metastizante, que leva à morte do animal portador em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase, mas que por sua vez, induz caquexia precoce do portador, levando-o à morte em 15 dias. Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES et al, 1995). Além disso, causa importantes mudanças metabólicas e eletrolíticas no animal (BOECKH-HAEBISCH, E.M. et al, 1998; SEELAENDER M.C. et al, 1996), bem como alterações hormonais como hipoinsulinemia, que contribuem no estabelecimento do estado de caquexia (FERNANDES, et al, 1990, 1991; FERNANDES, et al, 1997).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS E CÂNCER

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2003), a cada ano 10 milhões de pessoas tem diagnóstico positivo de câncer no mundo, ou seja, 12% das mortes totais. Estima-se que até o ano de 2020, serão 15 milhões de novos casos a cada ano. Diante deste quadro, muitos estudos estão sendo realizados no sentido de identificar as possíveis causas do aumento desordenado de muitas formas de câncer.

Desde 1960, estudos epidemiológicos sugerem correlação entre ácidos graxos e aparecimento de tumores. Há estimativa de que 30% de todos os casos estejam ligados à dieta, demonstrando que o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos n-6 e a baixa ingestão de ácidos graxos n-3, facilitam o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE, et cols, 2002).

Estudo evolutivo da dieta humana mostra que nossos ancestrais, do período Paleolítico, consumiam grande quantidade de proteínas, cálcio, potássio e agentes antioxidantes. Com a industrialização, houve aumento das calorias obtidas a partir das gorduras, em particular as saturadas, ácidos graxos n-6, associado a decréscimo na ingestão de n-3, antioxidantes e cálcio, em particular nas populações Ocidentais. Este aumento no consumo de n-6 nos últimos 100 anos (Figura 4), foi devido ao desenvolvimento da tecnologia na extração de óleos vegetais para uso na culinária doméstica (SIMOPOULOS, 2002).

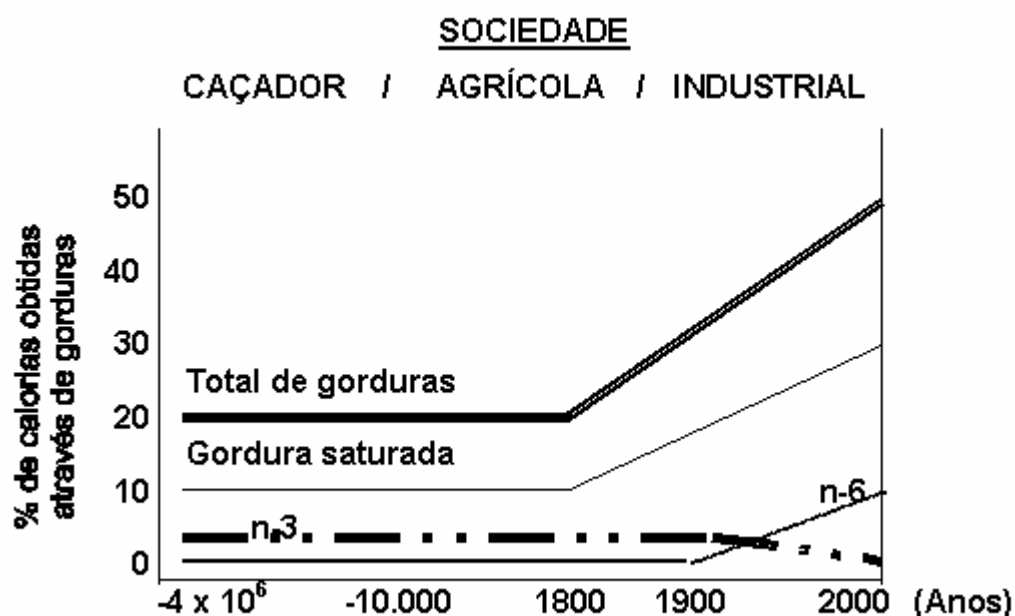


Figura 4: Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS, 2002.

Em populações como a do Alasca e da Groenlândia, a incidência de câncer é relativamente baixa quando comparada com a quantidade de gordura consumida. Sugere-se que o consumo de grande quantidade de ácidos graxos n-3 presentes em animais marinhos que eles consomem, exerça efeito protetor nestas populações (CURI, 2002).

Os ácidos graxos essenciais n-3 e n-6 são metabolicamente e funcionalmente distintos como citado anteriormente. Entretanto, para o bom funcionamento do organismo de mamíferos, a relação entre a ingestão destes dois ácidos graxos é considerada fundamental para a perfeita saúde e bom desenvolvimento do organismo.

Estudos epidemiológicos sugerem que com a acentuada desproporção entre os dois ácidos graxos essenciais, houve aumento no número de doenças crônico-degenerativas, como a diabetes, o câncer e a artrite. Entretanto, SIMOPOULOS et al (1999), mostra que, atualmente, a proporção entre n-6 e n-3 em países ocidentais chega a 25%, enquanto que no Japão, por exemplo, não alcança 0,12% (HIBBELN, 1998). Yehuda (1997), sugeriu como proporção ideal a de 2 a 3 partes de n-6 para 1 de n-3. De acordo ainda com SIMOPOULOS (2002), a ingestão diária de ácidos graxos essenciais deve obedecer à proporção de 1 parte de ômega-3 para 5 partes de ômega-6. Na verdade, devido a estas mudanças na dieta das populações ocidentais, houve elevação paralela no aumento desordenado de doenças degenerativas, auto-imunes, cardiovasculares e câncer. Dentre os aspectos considerados relevantes estão a redução do consumo de ácidos graxos ômega-3, e consequente aumento da ingestão de ácidos graxos ômega-6 e gorduras saturadas, aumentando assim, o risco de ocorrência de doenças crônicas degenerativas, presentes nas populações ocidentais.

Em contraste com a gordura saturada e monoinsaturada, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) n-3 tem sido demonstrados participarem na modulação de vários processos neoplásicos, reduzindo crescimento tumoral em diversos modelos animais (ROSE et al, 1997), enquanto que o elevado consumo de ácidos graxos n-6, favorece o desenvolvimento tumoral (CALDER, P.C.,2003). Estes dados são corroborados quando se avalia a incidência de câncer em populações orientais que consomem grande quantidade de gorduras de animais marinhos, ricos em n-3, e

apresentam baixa incidência de doenças crônicas degenerativas (TAPIERO, H. et al, 2002). Estes lipídios são capazes de modular a produção de eicosanóides, modificar a expressão gênica, alterar o metabolismo energético, função imunitária, fluidez das membranas, entre outras (CURI et al, 2002). Por este motivo, seus efeitos nos diversos tipos de câncer, nos processos de metástase e angiogênese têm sido investigados.

Um possível mecanismo pelo qual os AG n-3 poderiam estar atuando na inibição do desenvolvimento tumoral é através da peroxidação lipídica (LPO), que pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre lipídios de membranas celulares (CURI et al, 2002). Os radicais livres promovem a incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado presente na membrana das células, formando hidroperóxidos como produto primário. Os produtos da sua oxidação (lipoperóxidos) têm propriedades citotóxicas nas células tumorais (SUARÉZ, et al, 1996). Os produtos da LPO podem causar alterações na membrana e estrutura das células, alterações do citoesqueleto, levando a célula a entrar em apoptose (ZANETTI, R. et al, 2000). O mecanismo pelo qual os ácidos graxos n-3 atuam promovendo apoptose e consequentemente, a redução do desenvolvimento tumoral ainda não é conhecido. Entretanto, sabe-se que a suplementação crônica com o n-3 reduz crescimento tumoral, alterando a peroxidação lipídica e/ou produção de eicosanóides pelo tumor (TISDALE et al, 1996).

Vários trabalhos na literatura investigam o papel dos AG n-3 sob a ótica de dietas ricas ou pobres nos mesmos. Estas dietas têm variado de 8 a 20% de concentração de gordura na dieta (DOMMELS et al, 2002). Em adição, o tempo e a idade dos animais também são variáveis que têm sido exploradas, onde a duração da oferta da dieta ou suplementação vai de 4 a 16 semanas e a grande maioria trabalha com animais já na fase adulta. (TOGNI et al, 2003). Nós temos mostrado o incremento de gordura total ingerida em apenas 0,1 % na forma de óleo de peixe. O que nos diferencia dos demais é que , além da quantidade de gordura ofertada, a fase de suplementação inicia-se desde o pós –desmame até a geração F1. Ambas abordagens têm o mesmo efeito. Isto demonstra que quão mais cedo houver mudança de hábito alimentar, mais proteção o organismo terá contra o desenvolvimento tumoral (TOGNI et al, 2003; PINTO Jr et al,

2004). O mecanismo de ação do óleo de peixe em promover redução do crescimento tumoral ter efeito anticaquético e aumentar taxa de sobrevida ainda não foi esclarecido, mas as duas mais prováveis hipóteses seriam sobre o sistema imunitário ou diretamente sobre a massa tumoral. Neste estudo o foco de interesse é na última hipótese, investigando alguns dos mecanismos propostos.

2. OBJETIVOS

Tem sido demonstrado que o óleo de peixe tem a capacidade de reduzir o crescimento tumoral, entretanto, o mecanismo de ação não é totalmente sabido. Trabalhos prévios (TOGNI et al., 2003, PINTO Jr, 2004) têm confirmado esta capacidade, entretanto os mecanismos envolvidos não foram investigados. Diante disso, este trabalho tem como objetivo investigar a participação de alguns mecanismos sugeridos na literatura como participantes na redução do crescimento tumoral. Para alcançar este objetivo ratos foram suplementados com óleo de peixe durante 50 dias a partir do desmame e 14 dias após a inoculação do tumor determinamos:

- Peso do tumor
- A taxa de proliferação das células tumorais pela incorporação de [2- ¹⁴ C]- timidina em DNA;
- Taxa de apoptose
- Taxa de peroxidação lipídica;
- A expressão de COX-2 em células tumorais.
- Produção de Prostaglandinas E2 no tecido tumoral;

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 ANIMAIS

O estudo envolvendo animais foi aprovado pela CEEA do SCB da UFPR. Para a realização deste estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais após o desmame (21 dias) foram separados nos seguintes grupos de acordo com o tipo de suplementação: grupo não suplementado, grupo suplementado com óleo de peixe (N-3), grupo suplementado com gordura de coco (gordura saturada). Estes grupos receberam suas respectivas suplementações (1g/Kg p.c.) através de micropipeta até completarem 70 dias. Após este período, todos os animais do grupo sofreram inoculação subcutânea no flanco direito, de 1 mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2×10^7 células/mL, dando continuidade à suplementação descrita acima. Os animais foram sacrificados ao 12º dia após a inoculação do tumor, e o tumor retirado para cultivo de células e para determinações bioquímicas.

3.3 REAGENTES, ENZIMAS, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS

Todos os componentes dos tampões e os solventes foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira SA. Xilenol Laranja, meio de cultura (RPMI 1640) e hidroxitolueno butilado (BHT) provenientes da Sigma Chemical Co (St Louis, USA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino foram obtidos da Gibco (St Louis, USA). O kit para ELISA para quantificação de prostaglandinas E2 da Cayman Chemical – USA e as colunas para extração de prostaglandinas da Waters (Ireland). O óleo de peixe gentilmente doado pela Fundação Herbarium, contendo 1g/cápsula na proporção de 0,192 g de EPA e 0,124g de DHA e a gordura de coco da Indústria Brasileira Refino de Óleos do Brasil LTDA.

Materiais Radioativos. O substrato radiomarcado [2- ^{14}C]-timidina (50mCi/mmol) foi obtido da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company – Biotechnology Systems – USA).

3.4 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto 1 mL de suspensão de 2×10^7 células do tumor de Walker 256 tipo B. Após um período de cinco dias, quando constatada a ascite, o animal foi ortotanaziado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, seu abdômen foi massageado e, através de laparotomia mediana, foi retirado da cavidade abdominal, com pipeta Pasteur de plástico, o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi realizada através do uso de câmara de Neubauer. Da ascite obtida, o mesmo numero de células foi inoculada no flanco direito, subcutaneamente nos animais em experimento.

3.5 DETERMINAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS E DO TECIDO TUMORAL

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias no período da tarde, utilizando a balança Urano, modelo UDI 10000/1. Após serem sacrificados, a massa tumoral foi retirada e pesada em balança digital Denver Instrument XL-410 previamente aferida.

3.6 CULTIVO CELULAR

Uma vez isoladas as células do tumor de Walker 256, foram colocadas para cultivo em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L) contendo inicialmente 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços (volume 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 5% CO₂. Este método foi descrito por HUANG et al, 2000. Concomitantemente ao plaqueamento das células tumorais, foi adicionado 20 μ l de uma solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 μ Ci/poço). As células foram então cultivadas por um período de 48 horas. A timidina é análoga da base púrica timina e incorpora-se aos novos DNAs formados durante a proliferação. Após este período, as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para *vials* contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem da radioatividade em contador Beckman LS 6000.

3.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A taxa de peroxidação lipídica foi mensurada pelo método FOX ou xilenol laranja conforme descreve Jiang et cols (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja.

As amostras de tumor de Walker 256 foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão fosfato (PBS) 0,1 M em pH 7,4. (Homogeneizador Politron – 25000 rpm/min) O tecido foi então diluído novamente em PBS na proporção de 1:10, e 100µl deste homogeneizado (tecido tumoral + PBS) foram adicionados à 900 µl de solução de trabalho, contendo:

- MeOH 90%
- 100µM xilenol laranja (Sigma)
- 25mM de H_2SO_4
- 4mM de BHT
- 250µM de Fe_2SO_4

As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente lidas no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) em comprimento de onda de 560nm. O cálculo para determinação da quantidade de peroxidação lipídica no tecido tumoral foi realizado utilizando-se coeficiente de extinção molar $\epsilon = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

3.7.1 Determinação da quantificação protéica para peroxidação lipídica

A quantificação de proteína das amostras tumorais foram mensuradas pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, passível de ser detectada em comprimento de onda de 450nm, calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (o correto é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão). Foram diluídos 10 µl da amostra na proporção 1:10 em PBS. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 595nm.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO – (SDS-PAGE)

O método "SDS-PAGE" descrito por Laemmli em 1960 foi desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares.

O gel de empilhamento foi preparado a 7%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração de poliacrilamida do gel de separação foi de 12%.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-PAGE" por cerca de 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas pelo uso de anticorpos(Western Blotting).

3.8.1 “ Western Blotting”:

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, elas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi submetida a incubação com tampão de bloqueio, contendo leite em pó desnatado, para bloqueio de ligação inespecífica, durante duas horas. Após este período, a membrana foi incubada em tampão de incubação contendo o anticorpo primário para COX-2 (Goat polyclonal IgG – Santa Cruz Biotechnology). Após uma hora de incubação, a membrana foi submetida à outra incubação contendo segundo anticorpo voltado para o primeiro, conjugado com uma enzima. Esta enzima permite, pela adição de um substrato cromogênico ou quimioluminescente, a visualização da proteína identificada pelo anticorpo em filme Kodak para radiografia. As bandas foram analisadas por densitometria através do programa “Scion Image”.

3.9 QUANTIFICACAO DE PROSTAGLANDINAS E2

A determinação da concentração da prostaglandina E2 foi realizada por Kit para ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante, Cayman Chemical – USA.

3.10 APOPTOSE EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256.

Este processo foi realizado conforme descrito por AMARANTES-MENDES (1997), onde células tumorais (5×10^5 células/poço) foram ressuspensas em tampão contendo anexina V marcada com o fluorocromo fluoresceína (FITC), e mantidas protegidas da luz, em geladeira, por 24 horas. A anexina V é marcador de apoptose, pois se liga ao fosfolípídio fosfatidilserina, externalizado da membrana interna para a membrana externa, durante o início do processo de apoptose. A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS - *fluorescence activated cell sorter*), pela fluorescência da anexina V por célula (absorbância de 488 nm e emissão maior que 530 nm – canal FL1). Os dados foram expressos em porcentagem de fluorescência.

3.11 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média dos grupos experimentais, e submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PESO TUMORAL

Na figura 5, estão representados os dados de peso (g) da massa tumoral dos animais sem suplementação (W) e suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). O peso do tumor (g) no grupo W foi de 15,33, no WS de 21,46 e no WP de 7,82. A suplementação com óleo de peixe foi hábil em reduzir a taxa de crescimento tumoral ($p < 0,001$) quando comparada à do W e WS. Interessantemente, o grupo WS apresentou taxa de crescimento maior quando comparada à do W ($p < 0,001$).

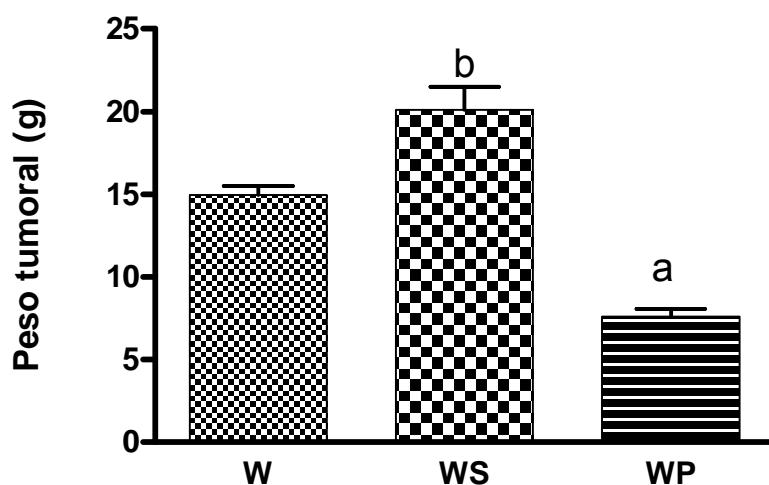


Figura 5: Peso (g) da massa tumoral obtida nos grupos não-suplementado (W), grupo suplementado com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados estão apresentados pela média \pm EPM de 18 animais do grupo W, 20 do WS e 26 do WP. a $p < 0,001$ quando comparado aos grupos W e WS e b $p < 0,001$ quando comparado ao grupo W.

4.2 TAXA DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DO TUMOR DE WALKER 256

Na figura 6, estão apresentados os dados da taxa de proliferação das células tumorais, em contagens por minuto (cpm), dos grupos suplementados com gordura de coco ou óleo de peixe (WS e WP) e do grupo controle (W). A taxa de proliferação das células tumorais dos animais suplementados com óleo de peixe foi duas vezes menor quando comparado à do W e WS ($p < 0,001$). Entre o grupo W e WS não houve diferença significativa da taxa de proliferação celular ($p > 0,05$).

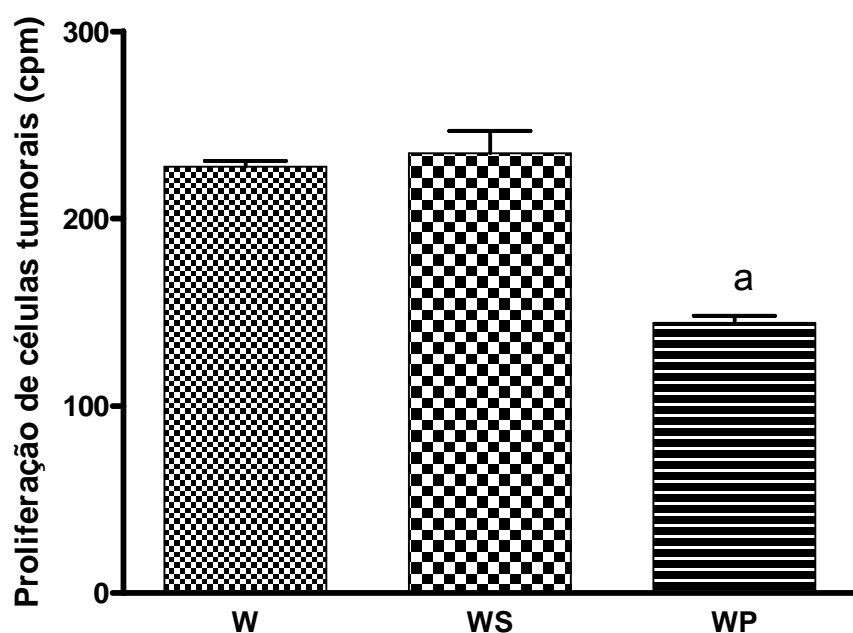
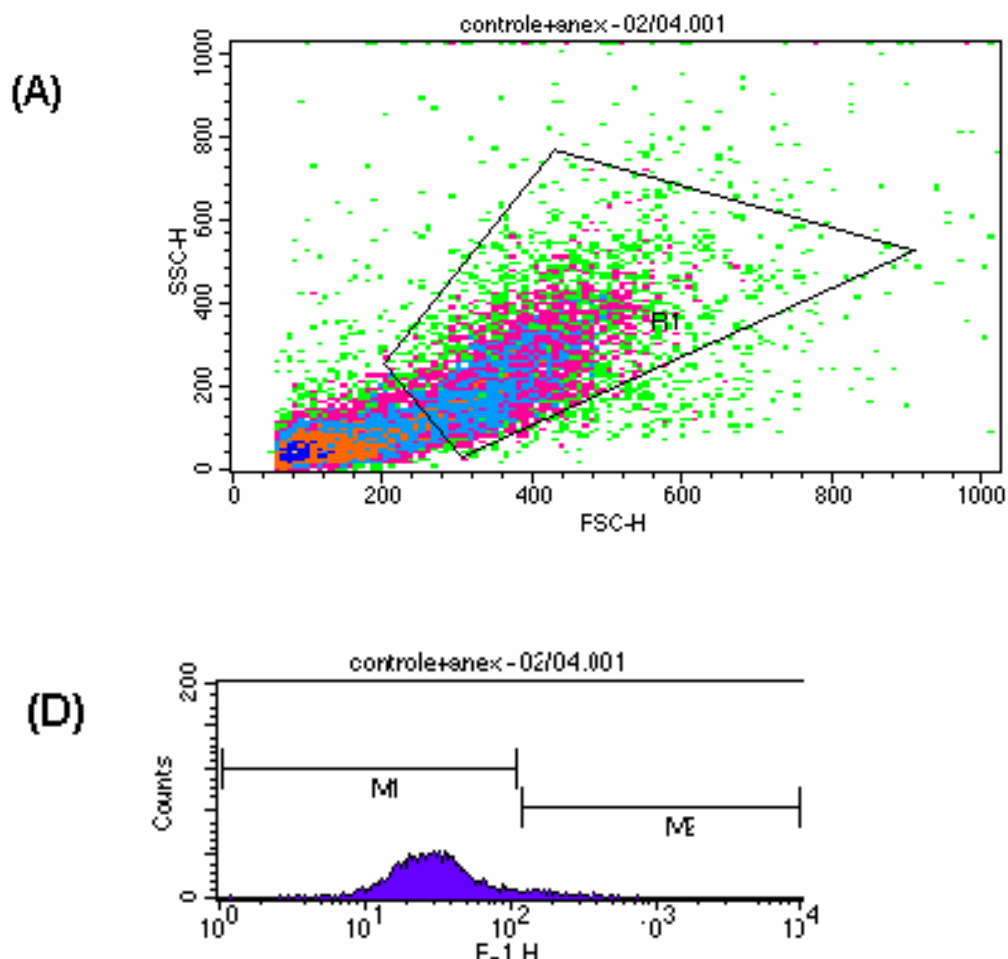
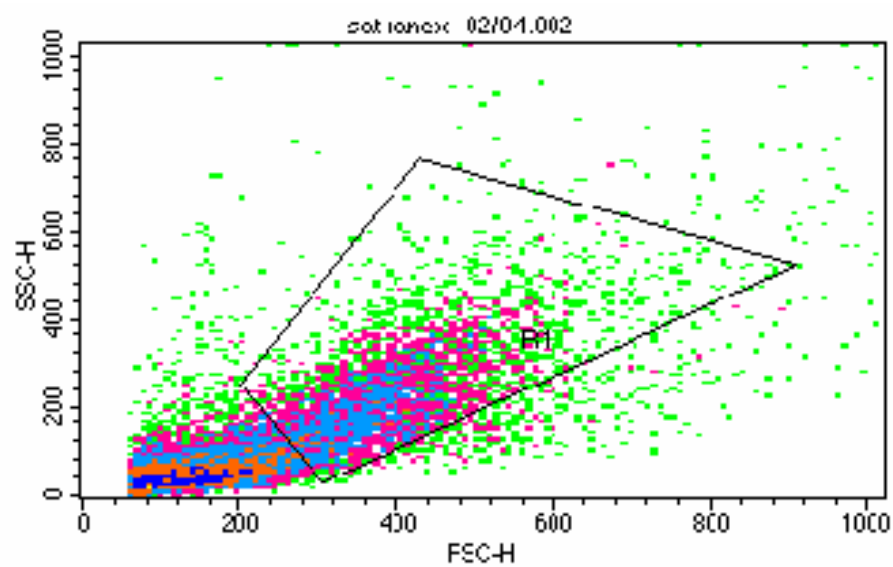
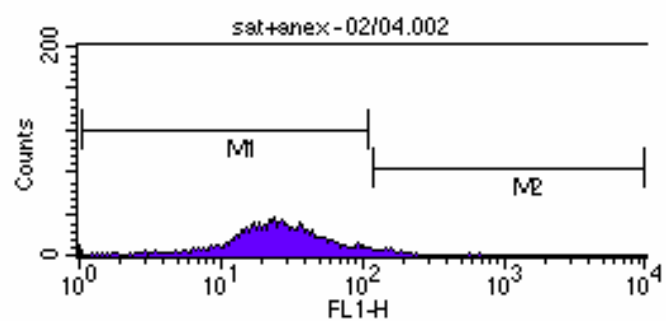


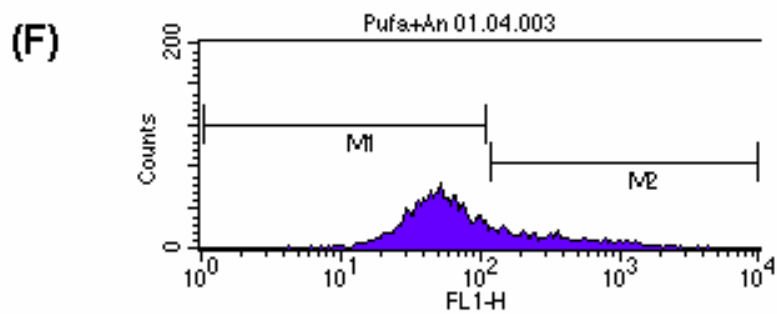
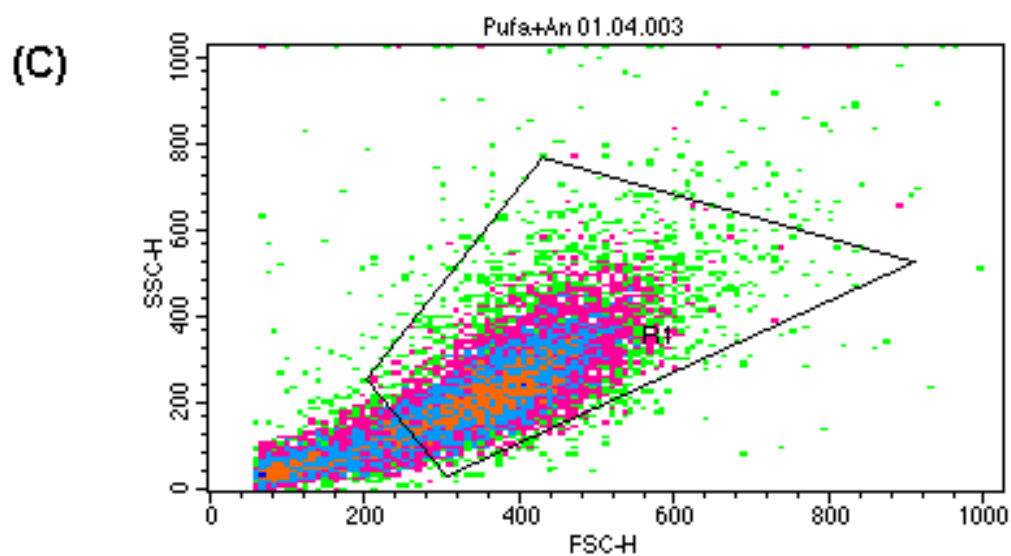
Figura 6: Taxa de proliferação das células de tumor de Walker 256, através da incorporação de (2-¹⁴C)-Timidina em DNA, dos animais dos grupos não suplementado (W), suplementado com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados estão apresentados com média \pm EPM de 23 amostras de W, 28 de WS e 46 de WP. a $p < 0,001$ quando comparado ao grupo W e WS.

4.3 TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

A taxa de apoptose foi determinada por citometria de fluxo e os dados em dot plot dos grupos não suplementado (A), suplementado com gordura de coco (B) ou óleo de peixe (C) analisado no “gate” M2 (D,E,F, respectivamente) foram construídas na forma de histograma para análise (Figura 7). A suplementação com gordura de coco não alterou a taxa de apoptose quando comparado ao grupo W ($p>0,05$). A suplementação com óleo de peixe, por sua vez, elevou esta taxa em aproximadamente 6 vezes quando comparado aos grupos W e WS ($p<0,001$).



(B)**(E)**



Onde, M1= células marcadas negativamente para anexina V e M2= células com marcação positiva para anexina V.

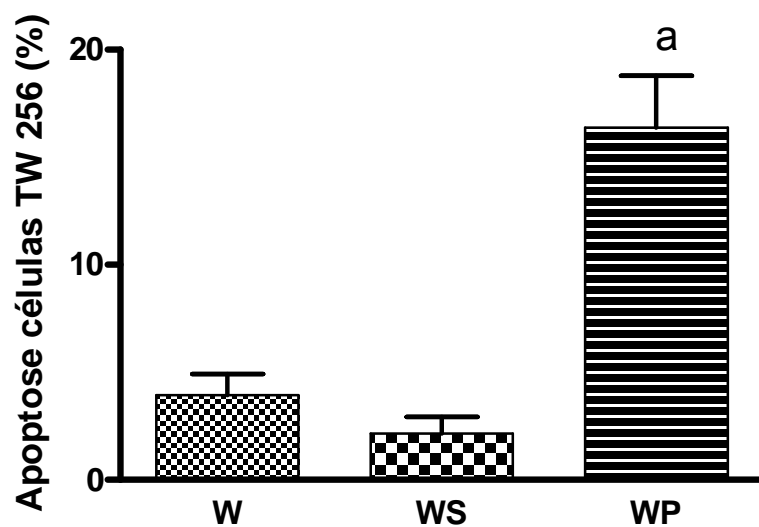


Figura 7: Taxa de apoptose (%) das células do TW256 dos animais dos grupos sem suplementação (W) e suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados representam a média \pm EPM de células obtidas de nove tumores por grupo.

a $p < 0,001$ quando comparado aos grupos W e WS.

4.4 TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO TECIDO TUMORAL

Na figura 8, são apresentados os resultados da taxa de peroxidação lipídica (mMol/mg de proteína) da massa tumoral obtida dos animais suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). No grupo não suplementado (W) e suplementado com gordura de coco (WS), a taxa de peroxidação lipídica não foi diferente ($p>0,05$). Por outro lado, a suplementação com óleo de peixe (WP) elevou a taxa de peroxidação lipídica em 3 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos W e WS ($p<0,001$).

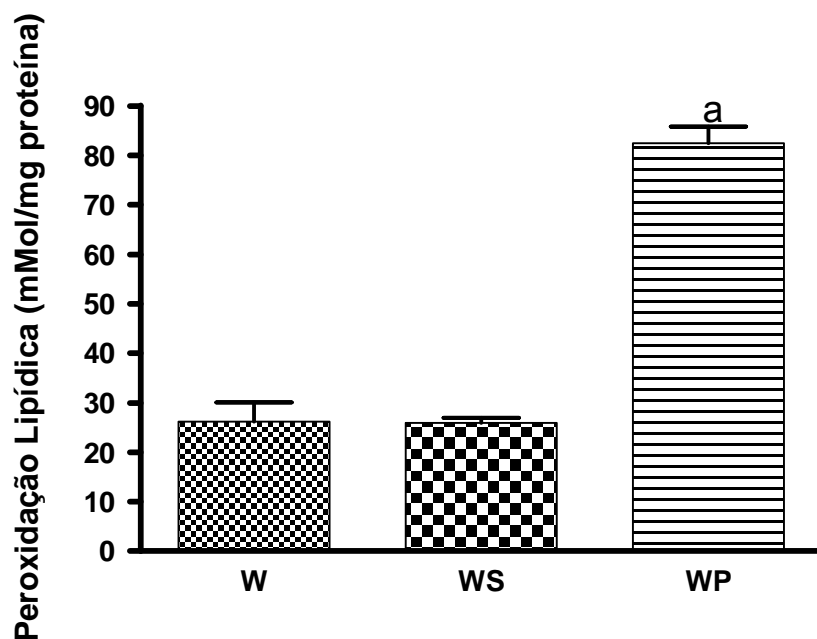


Figura 8: Taxa de peroxidação lipídica de tecido tumoral dos animais não suplementados (W), suplementados cronicamente com óleo de peixe (WP) ou gordura de coco (WS). Os dados estão expressos em média \pm EPM de 8 animais do grupo controle (W), 11 do grupo coco (WS) e 8 do grupo peixe (WP).
a $p<0,001$ quando comparado ao WS e W.

4.5 EXPRESSÃO DE COX-2 EM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

Os dados da figura 9 representam a expressão de COX-2 em tecido tumoral de ratos sem suplementação (W) e suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). A suplementação crônica com óleo de peixe reduziu a expressão de COX-2 em 2,2 vezes quando comparado à do grupo W ($p < 0,01$). Em adição, a suplementação com gordura saturada, aumentou a expressão de COX-2, em relação à do controle, em 1,3 vezes.

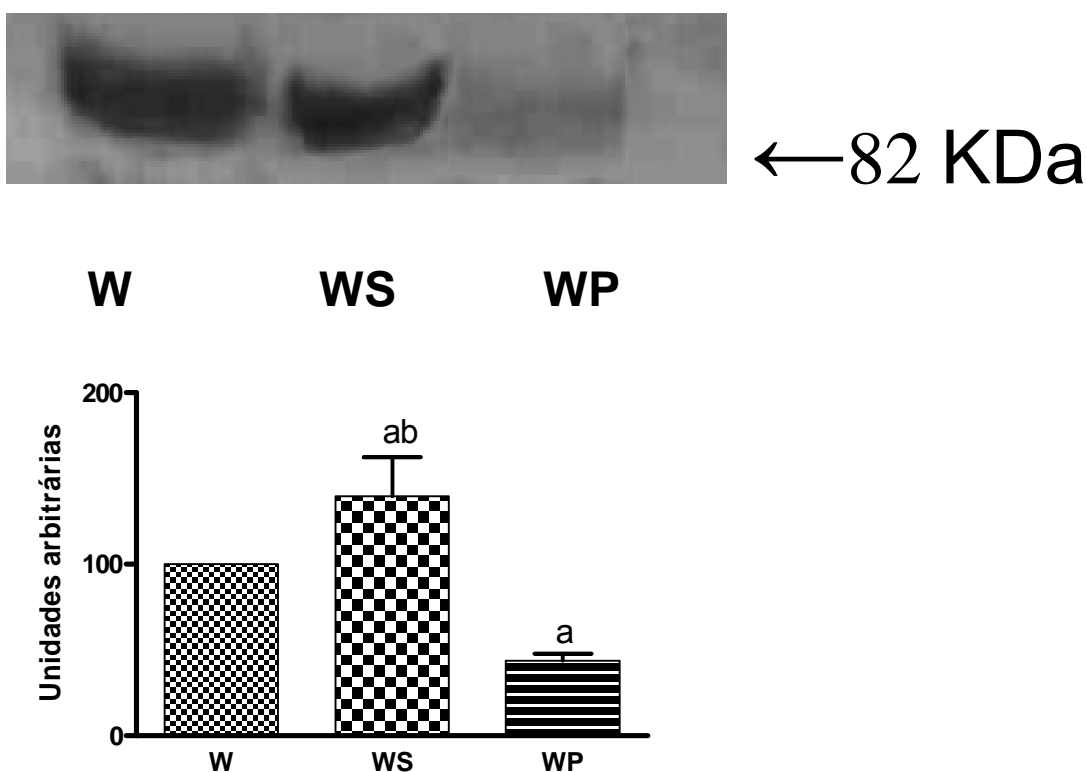


Figura 9: Expressão de COX-2 em tecido tumoral de ratos sem suplementação (W) e suplementados com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de unidades arbitrárias. a $p < 0.01$ quando comparado ao grupo W ; b $p < 0.001$ quando comparado ao grupo WP.

4.6 CONCENTRAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS E2 NO PLASMA DE RATOS PORTADORES DE TW256.

A suplementação com gordura de coco não modificou a concentração plasmática de prostaglandina E2 (Figura 10) quando comparada à do grupo não suplementado (W). Entretanto, a concentração de prostaglandina no grupo suplementado com óleo de peixe (WP), foi reduzida significativamente em 2,2 vezes quando comparada à do grupo W e WS ($p < 0,05$).

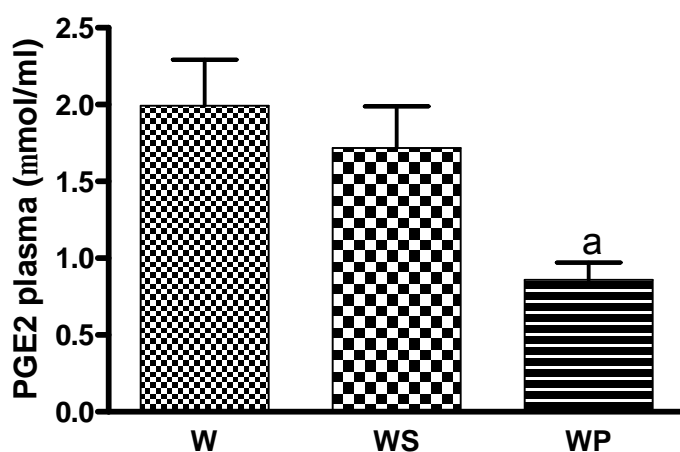


Figura 10: Concentração de prostaglandinas E2 ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos portadores de TW256 dos grupos sem suplementação (W) e suplementados cronicamente com gordura de coco (WS) ou óleo de peixe (WP). Os dados apresentam a média \pm EPM de 6 animais por grupo.

a $p < 0,05$ quando comparado com o grupo W e WS.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, devido ao aumento da taxa de crescimento de doenças auto-imunes, cardiovasculares, câncer e diabetes, se tem estudado mais profundamente o papel da dieta no organismo humano, e de que forma esta poderia estar favorecendo o aparecimento destas doenças. Há estimativa de que 30% de todos os casos de câncer estejam ligados a dieta, onde o consumo excessivo de gorduras saturadas (KUSHI e GIOVANUCCI, 2002) e ácidos graxos n-6 e a baixa ingestão de ácidos graxos n-3, tem sido mostrado facilitarem o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE, et cols, 2002). Na década de 60 foi relatado que esquimós apresentavam baixos índices de doenças cardiovasculares e câncer, o que levou ao estudo do papel do ácido graxo ômega-3 na função celular (ROYNETTE et al, 2004). A análise do padrão de dieta consumida por nossos ancestrais (2 milhões de anos atrás), mostra que consistia principalmente de muitas folhas, grãos e animais marinhos, ricos em PUFAs n-3 (SIMOPOULOS, 2002). Nos últimos 200 anos, com a revolução industrial e conseqüente industrialização de produtos, passamos a consumir muito mais gorduras saturadas e óleos de grãos que contem n-6. Ao mesmo tempo, houve acentuada redução do consumo do ácido graxo n-3 na dieta, o que tem sido relacionado ao aparecimento de diversas patologias (ROSE e CONNOLY, 1991; CAYGILL et al, 1994). Curi et al (2002), relataram que os ácidos graxos n-3 são hábeis em modificar a produção de eicosanóides, alterar a expressão gênica, metabolismo energético, função imunitária, fluidez de membranas, entre outras.

Este trabalho demonstra redução da taxa de crescimento tumoral (Figura 5) da mesma magnitude que os trabalhos realizados com dietas ricas em óleo de peixe (8-12%) (DOMMELS et al, 2002). Esse resultado dá suporte e corrobora as observações de menor incidência de câncer em populações de japoneses, esquimós e canadenses, povos que consomem grande quantidade de gorduras de animais marinhos, ricos em n-3 (TAPIERO, H. et al, 2002; ROYNETTE et al, 2004). Diferencia-se, portanto, dos demais na dose e tempo de consumo de ácido graxo na gordura, onde elevou-se o conteúdo de gordura em 0,1% (óleo de peixe) e o consumo foi desde o desmame até a

fase adulta. Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual o óleo de peixe induz a esta resposta, iniciou-se por investigar a taxa de proliferação celular. Ao cultivar as células tumorais obtidas dos animais suplementados com óleo de peixe (WP) ou gordura saturada (WS), obteve-se redução significativa da taxa de proliferação das células tumorais dos animais WP (Figura 6). Estes resultados e de outros autores sugerem que os ácidos graxos n-3 tem a habilidade de modificar a expressão gênica e portanto interferirem na taxa de proliferação celular. Assim, este seria um dos mecanismos pelo qual estes ácidos graxos reduziriam o crescimento tumoral. Apoptose é um mecanismo importante para controle do tempo de vida celular. Nos animais suplementados com óleo de peixe (WP) encontrou-se maior taxa de apoptose das células do tumor de Walker do que à dos animais sem suplementação ou dos suplementados com gordura de coco (Figura 7). Gillis et al (2002), examinaram a participação do ácido eicosapentaenóico (EPA – n-3) como indutor de apoptose e necrose secundária em células humanas promielocíticas HL-60 e demonstraram redução da taxa de crescimento tumoral *in vitro*. Este dado reforça o possível mecanismo do óleo de peixe modulando a redução da taxa de crescimento celular, que segundo sugestão do autor, ocorreria a nível gênico. LLOR et al (2003), descreveram em seu trabalho redução na taxa de proliferação das células tumorais Caco-2 e HT-29 quando tratadas com óleo de peixe e atribuíram este feito a eficácia do óleo de peixe na indução das células a apoptose. Em modelos de tumores animais, como o Walker 256, o ácido graxo EPA é preferencialmente hábil na inibição do crescimento tumoral, enquanto que o DHA é potente indutor de apoptose em células tumorais (DAS, 1999). Assim, o óleo de peixe tem efeito *in vitro* e *in vivo* na redução da taxa de crescimento tumoral e indução das células à morte celular programada. ROYNETTE et al (2004), relata a ação dos PUFA n-3 na família da proteína kinase C (PKC), a qual está envolvida na regulação da proliferação celular e apoptose. A PKC é superexpressa em câncer de cólon (SAUMA et al, 1996; SAXON et al, 1994) e torna o camundongo mais suscetível à indução da carcinogênese induzindo hiperproliferação. A expressão da PKC em células tumorais de cólon de ratos é regulada pela ingestão de dieta rica em óleo de peixe, diminuindo sua atividade e regulando a morte celular programada

(JIANG et al, 1996; DAVIDSON et al, 2000).

A proteína Ras tem sido demonstrada estar envolvida no processo carcinogênico. Recentes estudos sugerem que o efeito protetor dos ácidos graxos n-3, seja modulado de acordo com o tipo e nível de expressão de Ras encontrada no tecido tumoral (ROYNETTE et al, 2004). Assim, PUFA's n-3 provavelmente exercem importante papel na apoptose pela modulação da expressão de algumas dessas proteínas. Os trabalhos de CHEN e ISTFAN (2000) e CHIU e WANG (1999), relataram que a proteína antiapoptótica Bcl-2 teve suas concentrações intracelulares diminuídas pela ação do óleo de peixe, induzindo a um maior número de células tumorais a entrarem em apoptose. Da mesma forma, LLOR et al (2003) demonstraram que após tratamento das células HT-29 e Caco-2 com óleo de peixe por 4 horas in vitro, houve redução da expressão de COX-2. Ainda, a proteína antiapoptótica Bcl-2 determinada através de western blotting, também mostrou níveis reduzidos em sua expressão nestas células. Interessantemente, o momento máximo de inibição da expressão da proteína Bcl-2 coincidiu com o momento de maior percentual de células apoptóticas. Este estudo mostra uma relação entre COX-2 e Bcl-2 e sugere que a propriedade antiapoptótica da enzima COX-2 possa ser mediada pela sua capacidade de induzir a expressão de Bcl-2 (LLOR et al, 2003).

Está bem estabelecido e bem aceito que peróxidos e superóxidos gerados a partir de peroxidação lipídica promovem dano ao DNA e a outras funções celulares em condições patológicas. Em adição, foi também mostrado que algumas células tumorais são mais resistentes a peroxidação lipídica (DORMANDY, 1983; CHEESEMAN et al, 1984). A principal razão para esta resistência é provavelmente a deficiência da delta-6 desaturase nas células tumorais. Assim, as células tumorais têm ausência de substrato para peroxidar (HORROBIN, 1981; HORROBIN, 1990). Horrobin (1981) demonstrou que contornando esta deficiência, ou seja, fornecendo às células tumorais ácidos graxos ricos em insaturações (GLA, DGLA, EPA) resultou em excessiva produção de superóxidos e morte das células tumorais. Inibidores da COX e LOX não tiveram sucesso em bloquear tal ação, mas anti-oxidantes e a superóxido dismutase minimizaram tais efeitos (BEGIN e HORROBIN, 1985; BEGIN et al, 1988; DAS et al,

1987) Destes trabalhos surgiram hipóteses de que as desaturases (5 e 6) podem desempenhar papel crítico no câncer.

A peroxidação lipídica começa pela extração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos ricos em insaturações (AGRI) para formar um radical de ácido graxo (Figura 11). Isto pode ser iniciado pelos radicais hidroxil (OH^\cdot), peroxil (ROO^\cdot), alcóxil (RO^\cdot), superóxido (O_2^\cdot) e o perihidroxil (HO_2^\cdot). A geração de radicais de lipoperóxidos produz moléculas que são capazes de reagirem com outros AGRI e desse modo, iniciar nova reação e formando hidroperóxidos lipídicos e um novo radical de ácido graxo para posterior peroxidação (Figura 11). Os produtos de peroxidação gerados dessa maneira danificam a membrana celular e o DNA resultando em efeitos citotóxicos nas células cancerígenas.

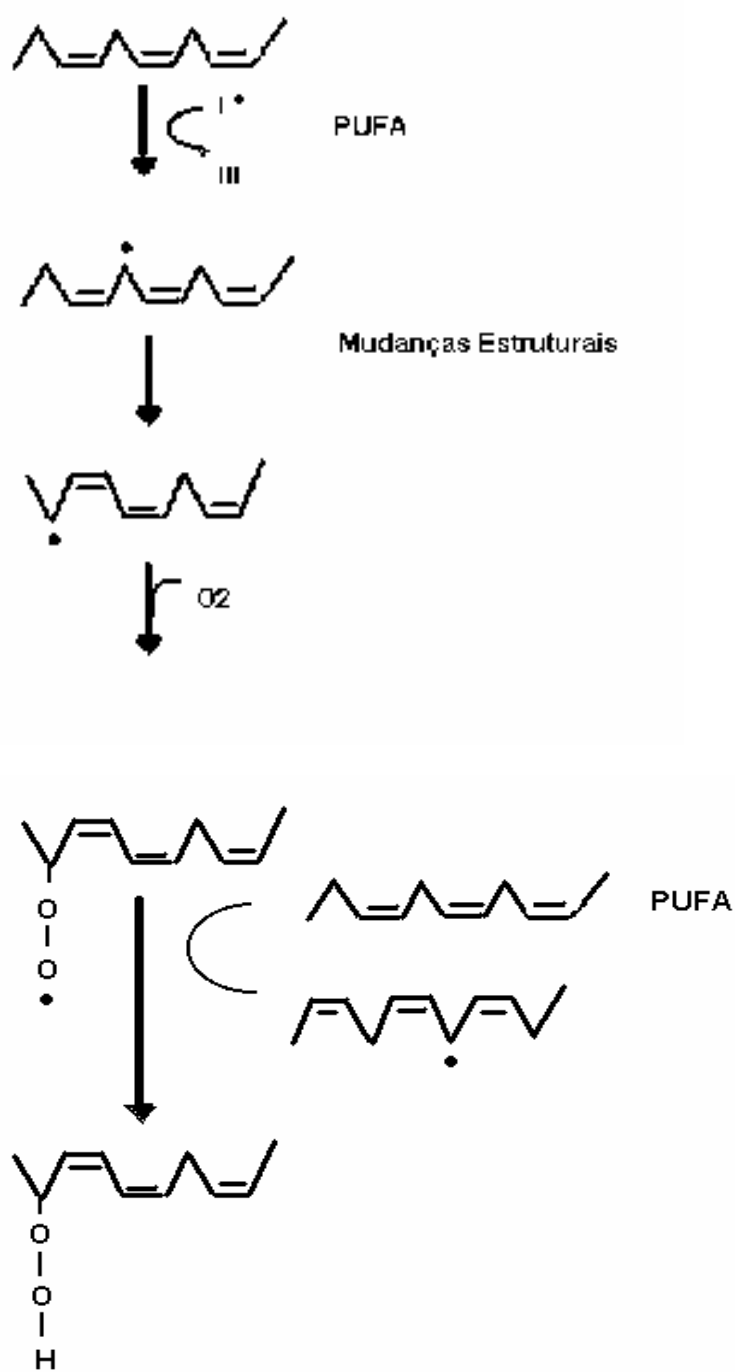


Figura 11 – Esquema da peroxidação lípidica

TOGNI et al (2003) demonstraram que ratos suplementados com óleo de peixe tem maior índice de insaturação em todos os tecidos bem como no tumor de Walker 256. Contudo, em seu trabalho não investigou a taxa de peroxidação nestes animais. Os dados da figura 8 mostram que a taxa de peroxidação lipídica (LPO) foi significativamente maior nos ratos suplementados com óleo de peixe quando comparada à dos animais sem suplementação ou suplementados com gordura de coco. GARCIA et al (2004) também examinou este parâmetro nos ratos portadores de tumor de Walker 256 e encontraram os mesmos resultados. Isto sugere que os LPO provavelmente atuam sobre a membrana das células, e/ou DNA, formando hidroperóxidos como produto final. Estes hidroperóxidos tem propriedades citotóxicas nas células tumorais (SUAREZ et al, 1996). Os ácidos graxos n-3 são mais suscetíveis à peroxidação lipídica devido ao número de duplas ligações existentes em sua cadeia carbônica (CURI et al, 2002). A suplementação com EPA pode induzir à ação de radicais livres e conseqüente morte das células tumorais (JIANG, 1998). Portanto, esse mecanismo (LPO) pode levar as células à apoptose e diminuir a taxa de crescimento tumoral. DOMMELS et al (2003) afirmaram que o óleo de peixe eleva o nível de apoptose e suprime a proliferação celular em animais, implicando a capacidade de modulação desse ácido graxo na morte celular programada. Propõem ainda que a dieta rica em óleo de peixe pode comprometer o mecanismo oxidativo celular, aumentando produção de radicais livres e conseqüentemente diminuindo viabilidade celular. Acredita-se que o número maior de insaturações presentes no tecido tumoral dos animais suplementados com óleo de peixe, como demonstrado por Togni et al (2003) foi responsável pelo aumento da taxa de peroxidação lipídica no grupo peixe (WP). HOFMANOVÁ et al, (2004) também comungam desta mesma interpretação pois afirmam que a suplementação crônica com óleo de peixe leva a incorporação dos ácidos graxos nas membranas da célula, estas se tornam mais suscetíveis à ação dos lipoperóxidos, levando a célula a entrar em apoptose. Acredita-se que o efeito citotóxico dos ácidos graxos n-3 deve-se a ação dos peróxidos lipídicos sobre a membrana das células quando os sistemas antioxidantes naturais (catalases, glutathione redutase e

vitamina E) encontram-se deficientes (CURI, 2002). A vitamina E é um antioxidante hábil em neutralizar as espécies reativas geradas pelos PUFA n-3. Estudos revelam que a apoptose causada pela LPO nas membranas celulares ricas em n-3, são suprimidas pela combinação de ácidos graxos e antioxidantes como vitamina E, reduzindo formação de hidroperóxidos e conseqüente morte celular (DOMMELS et al, 2003).O trabalho de GARCIA et al (2004), em adição, também demonstrou que tecidos normais (fígado, baço e pulmão) de ratos portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo de peixe, não apresentaram alteração significativa da LPO. Esse resultado deve-se provavelmente as enzimas antioxidantes presentes nesses tecidos. Este achado é importante pois demonstra que a suplementação é segura para tecidos não tumorais e provavelmente letal para o tecido tumoral.

A redução do crescimento tumoral também tem sido vinculada à modulação da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), a qual é expressa em altas taxas no tecido tumoral. A relação entre aumento da expressão da COX-2 e o câncer tem sido estabelecida em diversos trabalhos, como nos cânceres de mama, cólon e próstata (DEMPKE et al, 2001), tanto em modelos animais quanto em humanos. A expressão da COX-2 no tecido tumoral dos grupos suplementados com óleo de peixe estava diminuída significativamente quando comparada à dos grupos sem suplementação ou suplementados com gordura de coco (Figura 9). CHEN et al (2003), relataram que a expressão da COX-2 em tecidos normais é menor quando comparada à de tecidos com células modificadas. As dietas ricas em óleo de peixe poderiam suprimir a carcinogênese por reduzirem a atividade da COX-2, a qual induz a formação de prostaglandinas (PG) associadas à promoção tumoral. Assim, o EPA (n-3) inibiria o metabolismo do ácido araquidônico por competir pelas mesmas enzimas (ciclooxigenase e lipoxigenase), diminuindo assim formação de eicosanóides pró-cancerígenos, em especial PGE_2 (CURI et al, 2002). Estudos de CHULADA et. al (2000), apontam o papel das PGE_2 no desenvolvimento da carcinogênese e crescimento tumoral, fato este, vinculado a elevada taxa da prostaglandina encontrada em tecidos tumorais, maiores que em tecidos normais. Estas, atuam inibindo apoptose em células tumorais e promovendo proliferação (SUMITANI et al, 2001). Em

outro trabalho, TANG et al (1996), afirma que a regulação da expressão gênica de enzimas como a COX-2 tem sido demonstrada ser capaz de controlar apoptose celular, principalmente através da diminuição de prostaglandinas E2.

Em termos terapêuticos, há grande interesse na modulação da atividade da COX, pois esta é capaz de promover a angiogênese e o crescimento de tumores (KIM et al, 2003; BOUDREAU et al 2001). Assim vários trabalhos tem investigado o efeito da inibição desta enzima sobre o crescimento tumoral (NIXON et al, 2003; KIM et al, 2003; BOUDREAU et al 2001; LU et al, 2002; LLOR et al, 2003).

TAPIERO et al (2002) tem demonstrado que a expressão de COX-2 está intimamente relacionada com o aparecimento de tumores e aumento da taxa proliferação celular. Com base em seu trabalho e nos dados de proliferação celular e tamanho tumoral demonstrados neste estudo, sugere-se a participação da enzima COX-2 no crescimento tumoral em ratos portadores de Tumor de Walker 256. SIDDIQUI e WILLIAMS (1990) relataram a presença de altas concentrações de PGE_2 circulante em ratos portadores de Tumor de Walker 256 quando comparada à dos animais normais e, a fonte destas PGE_2 era o próprio tumor. COX et. al (2002) ressaltam em seu estudo, que a alta expressão de COX-2 encontrada em tecidos tumorais, aumenta formação de eicosanóides e produz aumento significativo na proliferação celular, sugerindo ligação entre produção de prostaglandinas e mitogênese.

Nos animais suplementados com óleo de peixe (figura 10) a concentração plasmática de PGE_2 estava reduzida significativamente quando comparada à dos animais sem suplementação ou suplementados com gordura de coco. A possível explicação para este achado é possível devido à redução da expressão da enzima cicloxigenase 2, bem como pela competição provocada pelo aumento da concentração de EPA na membrana das células tumorais em detrimento do AA (Togni et al., 2003). Esta observação é acompanhada por Dommels et al (2002), que em seu trabalho sobre a relação dos ácidos graxos n-3 e n-6 em câncer de cólon, relataram que os PUFA n-3 tem sido implicados na redução do crescimento tumoral através da inibição da produção de prostaglandinas E da serie 2 derivadas do ácido araquidônico. Este efeito se deve em grande parte pela habilidade do ácido graxo n-3 em se incorporar na

membrana das células, utilizando a enzima COX-2 na produção de prostaglandinas E da série 3, reduzindo conseqüentemente os níveis de prostaglandinas E2.

ARONSON et. al., (2001) também demonstraram que pacientes portadores de câncer de próstata, após 3 meses de suplementação com dieta contendo baixo teor de gordura mas rica em PUFA's n-3, apresentaram diminuição da expressão da enzima cicloxigenase 2. No trabalho de BADAWI et al (1998), a redução de COX-2 também foi relatada em animais com câncer de mama após a ingestão de dieta rica em n-3. Estes dados corroboram o resultado apresentado na figura 9 e dão suporte ao possível mecanismo de atuação desse ácido graxo. Outros trabalhos também investigaram o papel da COX-2 na apoptose celular. Estudo de IÑIGUEZ et. al., (2003), mostrou que inibidores específicos da COX-2 podem bloquear a cascata de apoptose em diversos tipos celulares. SMITH et al (2000), relacionaram expressão de COX-2 e inibição de apoptose em câncer colorretal. Outros trabalhos como o de JONES et al (1999) relataram que células de carcinoma de cólon em humanos quando cultivadas na presença de PGE2 in vitro, geraram aumento significativo de 4 a 5 vezes os níveis de Bcl-2 (antiapoptótica). Ainda, após tratamento das mesmas células com inibidores de COX, houve aumento da taxa de apoptose nessas células. O trabalho de PINTO Jr et al (2004), mostrou que a suplementação crônica com óleo de peixe associada a inibidor de COX-2 (naproxeno), conseguiu reduzir crescimento tumoral em ratos com TW 256, entretanto houve efeito aditivo. Isso demonstrou que o efeito antitumorigênico do óleo de peixe foi potencializado pela presença dos inibidores de cicloxigenase-2 ou vice-versa.

Angiogênese é fundamental ao desenvolvimento tumoral e é mediada principalmente pela ação de prostaglandinas E2 (FOLKMAM, 1990). Estas, atuam aumentando progressão tumoral, alterando morfologia celular, bem como mobilidade e migração. Estes efeitos diretos sobre o desenvolvimento tumoral devem-se à ação desta série de prostaglandinas que atuam como mediadores lipídicos promovendo entre outros eventos, a metástase e estimulando angiogênese. Em contra partida, uma nova série de prostaglandinas vem sendo estudada recentemente como potente agente anti-tumoral, a PGJ2. Estudos recentes mostram sua participação na inibição tumoral em

diversos tecidos como mama, próstata, colon, pulmão e esôfago. A série J de prostaglandinas é derivada dos produtos de degradação da prostaglandina D2 que está relacionada a processos como adipogênese, inflamação e tumorigênese. A 15-d-PGJ2 também é um produto final da PGD2 e é produzida por uma variedade de células como plaquetas e macrófagos, entre outras. HARRIS et al (2002), relatam o envolvimento da 15-d-PGJ2 em vários tipos de câncer, inibindo proliferação e estimulando a apoptose. Esta indução à apoptose ocorre geralmente através do PPAR γ , um receptor nuclear ligado à proliferação de peroxissomas. EIBL et al (2001), em seu estudo demonstraram que seis diferentes linhagens de câncer pancreático humano expressaram altos níveis de PPAR γ , apresentando redução do crescimento tumoral. Dados recentes de HEY-KYUNG NA e YOUNG-JOON SURH (2003) mostram que a administração do ligante sintético de PPAR γ , o GW 7845, durante dois meses, reduziu a incidência e o peso de tumores mamários em ratos, sugerindo que o efeito anti-proliferativo da ativação do PPAR γ esteja relacionado com sua capacidade no controle do ciclo celular, morte ou sobrevivência celular. CHEN et al (2002) em seu trabalho sugere que o ligante 15-d PGJ2 inibe a expressão da proteína antiapoptótica BCL-2 em células de câncer de colon, através da inibição da atividade do NF κ B, acarretando conseqüentemente o efeito apoptótico e redutor do crescimento tumoral nestas células. Devido a esta gama de efeitos anti carcinogênicos do PPAR γ e também do óleo de peixe, aventamos determinar no plasma de ratos portadores de TW256 a concentração de prostaglandina J2. Contudo esta não foi diferente entre os grupos (dados não mostrados), descartando a possibilidade do óleo de peixe agir sobre a via de formação da PGJ2.

6. CONCLUSÕES

O estudo com suplementação com apenas 1g/Kg p.c. de óleo de peixe foi capaz de reduzir peso tumoral e isto foi associado à redução da taxa de proliferação celular, da expressão de COX-2 e da concentração de prostaglandinas E2 plasmáticas e ainda, aumentar a taxa de apoptose e peroxidação lipídica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The growth of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. **Experimentia**, v. 24, p. 166-167, 1968

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, v. 59(6), p. 1338-1346, 1994

ARGILÉS, J.M.; COSTELLI, P.; CARBO, N.; PALLARES-TRUJILLO, J.; LOPES-SORIANO, F.J.. Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **International Journal of Oncology**, v. 14(3), p. 479-486, 1999.

ARONSON, W.J.; GLASPY, J.A.; REDDY, S.T.; REESE, D.; HEBER, D.; BAGGA, D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Basic Science**, v. 58, p. 283-88, 2001.

BADAWI, A.F.; SOHEMY, A.; STEPHEN, L.L.; GHOSHAL, A.K.; ARCHER, M.C. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and levels of p 21 in rat mammary glands. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 905-910, 1998.

BARBER M. D. The effects of an enteral supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v.81(1), p. 80-86, 1999b

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.

BEGIN ME., HORROBIN DF. Selected fatty-acids as possible second messengers for drug-induced cyto-toxicity. **Anticancer Research**. V. 5, p. 589, 1985.

BEGIN ME, ELLS G., DAS UN,H-ORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acids induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. **J Natl. Cancer Inst.** V. 80, p.188-94, 1988.

BLACK J.M.; NESHEIM M.C. and KINSELLA, J.E.. Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. **British Journal of Nutrition**, v.1, p. 283-294, 1994.

BOECKH-HAEBISCH, E.M., FERNANDES, L.C.; PONZONI, M.; SEELANDER M.C., and CURI, R.. cationic and water content in blood, skeletal muscle and liver of food restricted and Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy and Control**, v.5, p. 213-219, 1998.

BOUDREAU, M.D.; CHANMUGAN P.S. and HART, S.B.. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoids synthesis from arachidonic acid. **American Journal of Clinic Nutrition**, v.54(1), p. 110-117, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.142, p. 79-83, 1976.

CALDAROLA,L.; DEI POLI,G.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Oncology**, v.10, p. 246-249, 1968.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potencial application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 36, p. 433-446, 2003.

CAO, Z.; MATTISON,J.; ZHAO, Y.; JOKI, N.; GRASSO, M.; CHANG, N. Regulation of tumor necrosis factor- and fas-mediated apoptotic cell death a novel cDNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 227, p. 266-72, 1996.

CHEESEMAN,K.H.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.V. et al. Lipid peroxidation and lipid antioxidant in normal and tumor cells. **Toxicology Pathology**, v. 12, p. 235-9, 1984.

CHEN, H.; CHU, R.Y.; HSU, P.; LU, J.; LAI, K.; TSENG, H.; CHOU, N.; HUANG,M; TSENG, C.; HSIAO,M. Loss of e-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinoma. **Cancer Letters**, v. 201, p. 97-106, 2003.

CHEN, Z.; ISTFAN, N.. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells, **Prostaglandins, Leukotrienes, Essencial Fatty Acids**, v. 63, p. 301-8, 2000.

CHIU, L.; WANG, J.. Induction os apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of Bcl-2 expression. **Cancer Letters**, v. 145, p. 17-27, 1999.

CHULADA, P. C.; THOMPSON, M. B.; MAHLER, J. F.; DOYLE, C. M.; GAUL, B. W.; LEE, C.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; SMITHIES, O.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. **Cancer Research**, v.60, p. 4705-4708, 2000.

CURI, R; POMPÉIA, C, MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. Entendendo a Gordura: os ácidos graxos. Editora Manole, São Paulo, 2002.

DAS UM, HUANG YS, BEGIN ME, et al., Uptake and distribution of cis-unsaturated fatty acids and their effect on free radical generation in normal and tumor cells in vitro. **Free Radiological and Biological Med.**, v. 3, p. 9-14, 1987.

DAVIDSON, L.; BROWN, R.; CHANG, M.; MORRIS, J.; WANG, N.; CARROL, R.; TURNER, N.; LUPTON, J.; CHAPKIN, R. Morphodensitometric analysis of protein kinase C beta (II) expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1513-9, 2000.

DE WYS, W.D. Management of cancer cachexia. **Seminars in Oncology** ., v. 12, 452. 1995.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v.127, p.411-417, 2001.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B.. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

DOMMELS, Y.E.M.; HEEMSKERK, S.; VAN DER BERG, H.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B.V.. Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1739-47, 2003.

DORMANDY, T.L.. An approach to free radicals. **Lancet**, ii p. 1010-4, 1983.

EARLE, E.R. A study of the Walker rat mamary carcinoma 256, *in vitro and in vivo*. **American Journal Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935

EIBL, G.; WENTE, M.N.; REBER, H.A.; HINES, O.J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ induces pancreatic cancer cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 287, p. 522-529, 2001.

FAGUNDES, L.A. Ômega-3 e ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças. Porto Alegre, RS. Fundação de Radioterapia do Rio Grande do sul, 2002.

FERNANDES, L.C. Alterações Metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. Tese de Doutorado, USP, São paulo, 1995.

FERNANDES, L.C.; NOGUEIRA C.R.; MACHADO, U.F; CARPINELLI, A.R., and CURI, R.. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology**, v.258, p. E1033-E1036, 1990.

FERNANDES, L.C. and CURI, R.. Reversion of Walker 256 tumor cachexia by insulin treatment. Possible mechanism involved and perspectives for future research. **Endocrine-Related Cancer**, v.4, p. 1-10, 1997.

FOLKMAM, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Natl. Cancer Institute**, v. 82, p. 4-5, 1990.

GARCIA, E.M. **Determinação da taxa de peroxidação lipídica no tumor de Walker 256 de ratos suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Curitiba, 2004. Monografia (Obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná.

GILLIS, R.C.; DALEY, B.J.; ENDERSON, B.L.; KARLTAO, M.D. Eicosapentaenoic Acid and γ -linolenic acid induce apoptosis in HL-60 cells. **Journal of Surgical Research**, v. 107, p. 145-153, 2002.

GURR, M.; GARROW, J.S.; JAMES, W.P.T; Fats. **Human nutrition and Diabetics**. Churchill Livingstone, London, p. 77-102, 1996.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in immunology**, v. 23, p. 144-150, 2002.

HIBBELN, J.R. Fish consumption and major depression. **Lancet**, v.351, p. 1213, 1998.

HOFMANOVA, J.; VACULOLA, A.; KOZUBIK, A.. Polyunsaturated fatty acids sensitize human colon adenocarcinoma HT-29 cells to death receptor-mediated apoptosis. **Cancer Letters**, p.1-9, 2004.

HORROBIN, D.F. Loss of Δ -6 desaturase activity as a key factor in ageing. **Age**, v.4, p. 139, 1981.

HORROBIN, D.F. Essential fatty acids, lipid peroxidation and cancer. New York, 1990.

HUANG, M.; MUDDANA, S.; HORAVITZ, E.N.; McCORNICK, C.C.; INFANTE, J.P. and BRENNAN, T.. High-Precision Isotope Ratio Mass Spectrometry and Stable Isotope Precursors for Tracer studies in cell culture. **Analytical Biochemistry**, p. 80-86, v. 287, 2000.

IÑIGUEZ, M.A.; RODRÍGUEZ, A.; VOLPERT, O.V.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends Mol Med.**, v.2, p. 73-8, 2003.

JIANG, Y; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P.. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe^{+2} in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JIANG, Y.; LUPTON, J.; CHANG, W.; JOLLY,C.; AUKEMA,H.; CHAPKIN,R.. Dietary fat and fiber differentially alter intracellular second messengers during tumor development in rat colon. **Carcinogenesis**, v.17, p.1227-33, 1996.

JING, W.G.; BRYCE,R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology/Hematology**, v. 27, p. 179-209, 1998.

JONES, P.A.; LEA, L.J.; PENDLINGTON, R.V. Investigation of the potential of conjugated Linoleic acid (CLA) to cause Peroxisome proliferation in Rats. Food and Chemical Toxicology, v. 37, p. 1119-1125, 1999.

KIM, H.J.; WU, H.; PARK, I.A.; HÁ, S.W.. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. **Journal Radiation Oncology Biology**, v. 55, p. 16-20, 2003.

KUSHI, L. and GIOVANNUCCI, E. Dietary fat and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 63-70, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lipídios. In: _____ **Principios da Bioquímica**. Editora Sarvier, São Paulo, 1998, p. 179-199.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MAÑE, J.; FERNANDEZ, F.; GASSULL, M. A.. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical nutrition**, v. 22(1), p. 71-79, 2003.

LU, S.; ZHANG, X.; BADAWI, A.F.; SOHEMY, A.; ARCHER, M.C. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib promotion of mammary tumorigenesis in rats fed a high diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids. **Cancer Letters**, v. 184, p. 7-12, 2002.

McENTEE, M.F. and WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed Pharmacother**, v.56, p. 380-387, 2002.

NA, H-K. and SURH, Y-J. Peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1381-1391, 2003.

NIXON, J.B.; KAMITANI, H.; BAEK, S.J.; ELING, T.E. Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPAR γ ligands in colorectal carcinoma cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 323-330, 2003.

PINTO, J.A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.H.; NALIWAICO, K.; FERRAZ, A.C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol and insulin administration reduce tumora growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **The Journal of nutritional Biochemistry**, v.15, p. 358-365, 2004.

ROSE, D.P.; CONOLLY, J.M. Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. **Breast Cancer Research** , v. 46, p. 225-237, 1997.

ROSE, D.P.; CONNOLY, J.M.. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 217-244, 1999.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C.. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutritional**, v.23, p. 139- 151, 2004.

SAUMA, S.; YAN, Z.; OHNO, S.; FRIEDMAN, E.. Protein kinase C beta 1 and protein kinase C beta 2 activated p57 mitogen-activated protein kinase and block differentiation in colon carcinoma cells. **Cell Growth Differentiation**, v.7, p. 787-94, 1996.

SAXON, M.; ZHAO, J.; BLACK, J.. Activation of protein kinase C isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells in situ. **Journal Cell Biology**, v. 126, p. 744-63, 1994.

SEELANDER M.C., AMBRICO, C.; RODRIGUES, M.C.P.S.; BOECKH-HAEBISCH, E. and CURI, R.. Hormonal alterations in Walker 256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance of cachexia. **Cancer Research Therapy and Control**, v.5, p. 29-33, 1996.

SIDDIQUI, R.A.; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin E₂ in the development of cancer cachexia. **Medicinal Science**, v. 15, p. 45-46, 1987.

SIMOPOULOS, A.P.. Essential Fatty Acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinic Nutrition*, v.70, p. 560S-569S, 1999a.

SIMOPOULOS, A.P.; LEAF, A.; SALEM, N.J. Essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. **Annals of nutrition and Metabolism**, v. 43, p. 127-130, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 00, 2002.

SMITH, W. L.; DE WITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v.69, p. 145-82, 2000.

SUARÉZ, A.; FAUS, M.J.; GIL, A. Dietary supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids increases susceptibility of weanling rat tissue lipids to in vitro lipid peroxidation. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p. 252-260, 1996.

SUMITANI, K.; KAMIJO, R.; TOYOSHIMA, T.; NAKANISHI, Y.; TAKIZAWA, K.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E₂ production. **Journal of Oral Pathology Medical**, v. 30, p.41-47, 2001.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.56, p. 215-222, 2002

THEOLOGIDES, A. Cancer cachexia. **Câncer**, v. 43, p. 2004-2012, 1979.

TISDALE, M.J.. Induction of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, v. 12, p. 531-533, 1996

TISDALE, M.J. Cancer Cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, v. 13(1), p. 1-7, 1997

TOGNI, V., OTA,C.C.C.; FOLADOR,A.; TCHAIKOVSKI JUNIOR,O.; AIKAWA,J.; YAMASAKI,F.; FREITAS,F.A.; LONGO, R.; MARTINS,E.M.; CALDER,P.C.; CURI, R. and FERNANDES,L.C.. Cancer Cachexia and Tumor Growth Reduction in Walker 256 Tumor-Bearing Rats Supplemented with n-3 Polyunsaturated Fatty acids for One Generation. **Nutrition and Cancer**, v.46(1), p. 52-58, 2003.

WILLIAMS, C.S.; LUONGO, C.; RADHIKA, A.; ZHANG, T.; LAMPS, L.W.; NANNEY, L.B.; BEAUCHAMP, R.D.; DUBOIS, R.N., **Gastroenterology**, v. 111, p. 1134-1140, 1996.

ZANETTI, R. and CATALÁ, A.. Changes in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids during lipid-peroxidation of mitochondria obtained from rat liver and several brain regions: effect of α -tocopherol. **Prostaglandins, Leukotrienes and Fatty Acids**, v.62(6), p.379-385, 2000.